



TITLE:

腎細胞癌におけるProliferating cell nuclear antigenの発現と予後の関係について：病理組織学所見および核DNA量との比較

AUTHOR(S):

中野, 清一; 川村, 壽一

---

CITATION:

中野, 清一 ...[et al]. 腎細胞癌におけるProliferating cell nuclear antigenの発現と予後の関係について：病理組織学所見および核DNA量との比較. 泌尿器科紀要 1995, 41(5): 343-348

ISSUE DATE:

1995-05

URL:

<http://hdl.handle.net/2433/115505>

RIGHT:

# 腎細胞癌における Proliferating cell nuclear antigen の 発現と予後の関係について

—病理組織学所見および核 DNA 量との比較—

三重大学医学部泌尿器科学教室（主任：川村壽一教授）

中野 清一，川村 壽一

## PROLIFERATING CELL NUCLEAR ANTIGEN EXPRESSION AS A PROGNOSTIC INDICATOR FOR RENAL CELL CARCINOMA: COMPARISON WITH PATHOLOGIC FEATURES AND DNA CONTENT

Seiichi Nakano and Juichi Kawamura

*From the Department of Urology, Mie University School of Medicine*

In the present study the prognostic value of proliferating cell nuclear antigen (PCNA) index and tumor DNA content were evaluated in 100 patients with renal cell carcinoma. The survival rate of patients with aneuploid tumors was not significantly different from that of those with diploid tumors. DNA ploidy could not be a prognostic factor. PCNA expression was determined by immunohistochemical staining using the PC10 clone. PCNA indices ranged from 2.6 to 33.6% with mean indices of 10.2, 15.7 and 27.9% for grades 1 to 3. There was a significant difference between the indices of each grade of tumor. Patients with a PCNA index of less than 13.6% had a longer survival time than the patients having tumors with a PCNA index of more than 13.6% ( $p<0.05$ ). Furthermore, within the group of grade 2 tumors, patients with a lower PCNA index had a significantly better prognosis ( $p<0.05$ ). Our findings demonstrated that the PCNA index provides significant prognostic information for renal cell carcinoma.

(Acta Urol. Jpn. 41: 343-348, 1995)

**Key words:** Renal cell carcinoma, PCNA, DNA ploidy, Prognostic factor

### 緒 言

腎細胞癌の予後は個々の症例により多彩であり，発育速度が広い範囲にわたっていることが推測される。腎細胞癌における腫瘍細胞の増殖能の評価は，他の悪性腫瘍の場合と同様に，手術後の補助化学療法必要性，患者の予後の判定等，臨床上有意義な情報をもたらすと考えられる。

1978年，Miyachi<sup>1)</sup>らにより報告された proliferating cell nuclear antigen (PCNA) は，その後 G1 後期から S 期にかけて合成される DNA polymerase- $\delta$  の補助蛋白質であり，細胞増殖能と密接に関連していることが示された<sup>2)</sup>。

最近，PCNA に対するモノクローナル抗体が開発され<sup>3)</sup>，パラフィン包埋切片での増殖細胞の染色が可能となった。われわれは，すでに臨床経過の判明して

いる腎細胞癌のパラフィン包埋標本を用い，抗 PCNA 抗体で染色し，あわせて flow cytometry (以下 FCM) による核 DNA 量解析の測定を行い，これらのパラメーターの臨床的有用性について検討したので報告する。

### 対象と方法

対象症例：1983年より1994年までに，当科において腎摘出術がなされ，病理組織学的に腎細胞癌と診断された100症例（男71例，女29例，16歳～88歳，平均59.2歳）を対象とした。腎摘出後の観察期間は1カ月から127カ月（平均37カ月）であった。腎癌取扱い規約<sup>4)</sup>による組織学的異型度は，G1：45例，G2：52例，G3：3例であり，Robson の stage 分類は stage I：69例，stage II：9例，stage III：17例，stage IV：5例であった。

術後補助療法として, stage I (69例) に対しては, 9例に  $\alpha$ 型インターフェロン, 1例に 5-FU 系制癌剤が投与され, 59例は術後経過観察のみであった. stage II 以上 (31例) に対しては, 術後全身状態の悪化した2例を除く29例全例に  $\alpha$ 型インターフェロンを中心とした補助療法が行われた. stage I において, 術後補助療法を行った群と術後経過観察のみの群の5年生存率はそれぞれ100%, 96.2%で有意差は認めなかった.

標本: すでに作製ずみの各症例の HE 標本より, 核 DNA 量測定に適した部位すなわち壊死部分が少なく, 癌細胞成分の密度の高い部分を選択した. そして, 同一部分のパラフィン包埋ブロックを  $5\mu\text{m}$ ,  $50\mu\text{m}$  に薄切し, それぞれ PCNA 染色, 核 DNA 量測定に用いた. 全症例とも, 標本摘出から固定までの時間は約2~3時間で, 10%ホルマリン液にて約12~24時間固定後にパラフィン包埋処理されていた.

PCNA 染色: PCNA 染色は, 薄切片を型通り脱パラフィンし, 0.3%  $\text{H}_2\text{O}_2$  液にて内因性ペルオキシダーゼ活性を阻害し, 10%正常血清で非特異的反応を防いだ. 一次抗体は抗 PCNA マウスモノクローナル抗体 (DAKO 社) を用い, 50倍に希釈し湿室内室温にて2時間反応させた. PBS にて洗浄後, ビオチン化二次抗体と30分, 調整済みの ABC 溶液と1時間, いずれも湿室内室温にて反応させた. 最後に  $3,3'$ -D-AB  $\cdot$   $\text{H}_2\text{O}_2$  液で発色させ, 核染色にはヘマトキシリン液を用いた. 陰性対照は, 一次抗体の代わりに同量の PBS を反応させ, 以後まったく同様に処理したものとした. 光学顕微鏡400倍下で PCNA 染色性が最も高い領域を選択し, 異なる数視野で1,000個の癌細胞を観察し, 全観察癌細胞に占める PCNA 陽性細胞の割合を labeling index (LI: %) として算定した.

核 DNA 量の測定:  $50\mu\text{m}$  の切片をキシレンにて脱パラ, 再水和したのち, Vindeløv ら<sup>5)</sup>の方法に準じ, スペルミンを含む0.25% trypsin にて  $37^\circ\text{C}$  で一昼夜インキュベートし, 細胞分離と裸核化を行った. さらに, 細胞浮遊液から組織片や大きな細胞集塊を除くために  $50\mu\text{m}$  ナイロンメッシュで濾過し, RNase で処理後, propidium iodide で核の DNA 染色を行った. FCM は, FACScan<sup>TM</sup> (Becton Dickinson 社) を用い, 最低10,000個の核を測定し, DNA ヒストグラムとして表わした. diploid standard としては, 凍結保存された正常腎皮質組織を用いた. 細胞周期の解析は cell FIT cell cycle analysis version 1.2 を用いて行った. 測定した検体の DNA ヒストグラムのパターンより, 2C に単一ピー

クを有する場合を DNA diploid と判定し, 他に異常ピークを有するものを DNA aneuploid とした.

統計解析: 各群の有意差検定には t 検定,  $\chi^2$  検定を用い, 生存率の算出には Kaplan-Meier 法 (検定は generalized Wilcoxon) を用いた.

## 結 果

### 1. PCNA 染色性

抗 PCNA 抗体による呈色は核に限局し, びまん性もしくは顆粒状に染色されていた (Fig. 1). PCNA 陽性の判定は, 陰性対照を基準とし, これよりも強い染色性を示すものを陽性とした. 対象症例全例において PCNA 陽性細胞を検出可能であり, LI は  $2.6 \sim 33.6\%$  の範囲で認められ, 平均  $13.6 \pm 6.8\%$  (mean  $\pm$  SD) であった.

### 2. Grade 別 PCNA 陽性率 (Fig. 2A)

grade 1, 2, 3 それぞれの LI は  $10.2 \pm 5.1$ ,  $15.7 \pm 6.2$ ,  $27.9 \pm 5.1\%$  (mean  $\pm$  SD) であった. grade が高いほど LI は高値を示し, 各群間に統計学的有意差を認めた.

### 3. Stage 別 PCNA 陽性率 (Fig. 2B)

stage 別に LI を比較した. stage I 群は  $11.5 \pm 5.2\%$  (mean  $\pm$  SD) と LI は低かったのに対して, stage II 群は  $14.7 \pm 5.0\%$ , stage III 群は  $19.5 \pm 8.6\%$ , stage IV 群は  $21.3 \pm 4.7\%$  と stage が進行するに従い LI も高くなり, stage III 群, stage IV 群は stage I 群に対し統計学的に有意に高値を示した ( $P < 0.01$ ).

### 4. DNA ヒストグラム

コントロール10腎では全例 diploid を示し, 4C の細胞数は 2C の5%以下であった. 検討した100例では, diploid は44例 (44%) に, aneuploid は56例

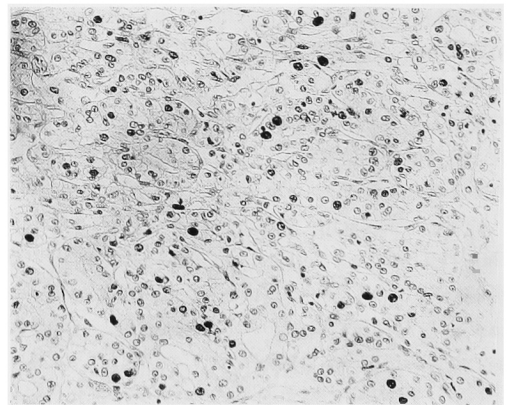


Fig. 1. Immunohistochemical staining of PCNA counterstained with hematoxylin in renal cell carcinoma.

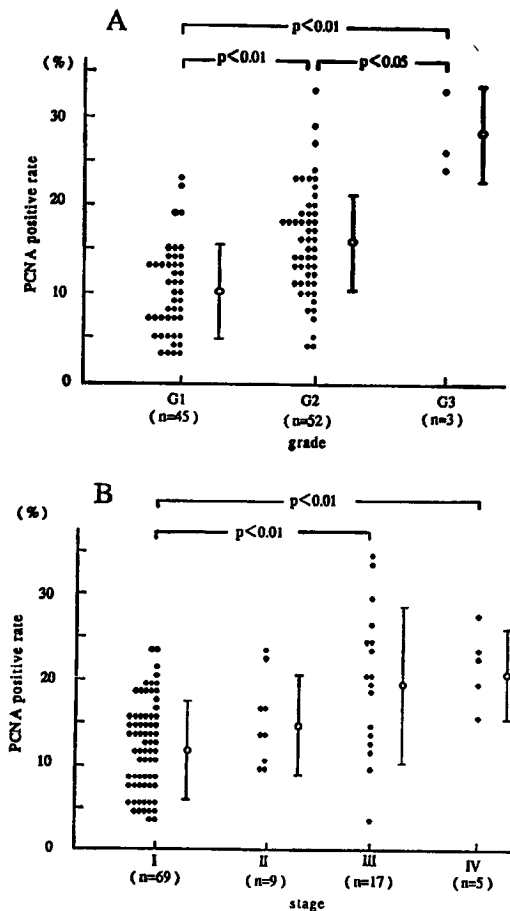


Fig. 2. Relationship between PCNA positive rate and pathological grade (A) and stage (B).

(56%) に認められた. 100例中16例は2個の検体で測定しえたが, 4例(25%)にDNA heterogeneityを認めた.

#### 5. Grade と ploidy (Table 1)

Grade 1 では45例中20例(44%), grade 2 では52例中33例(63%), grade 3 では3例全例(100%)にaneuploidを認め, gradeの上昇とともにaneuploid占める割合は増加したが, 統計学的有意差は認められなかった.

#### 6. Stage と ploidy (Table 2)

Ploidyと臨床病期との関係を, Table 2に示した. stage II, III, IV群はstage I群に対しaneuploidの比率が大きい傾向にあったが, 統計学的有意差は認められなかった.

#### 7. Ploidy 別 PCNA 陽性率

PCNAのLIをploidy pattern別にみると,

Table 1. DNA ploidy vs. pathological grade

Grade	Diploid (%)	Aneuploid (%)	Total
G1	25 (55)	20 (45)	45
G2	19 (37)	33 (63)	52
G3	0 (0)	3 (100)	3
Total	44 (44)	56 (56)	100

Table 2 DNA ploidy vs. stage

Stage	Diploid (%)	Aneuploid (%)	Total
I	35 (51)	34 (49)	69
II	2 (22)	7 (78)	9
III	6 (35)	11 (65)	17
IV	1 (20)	4 (80)	5
Total	44 (44)	56 (56)	100

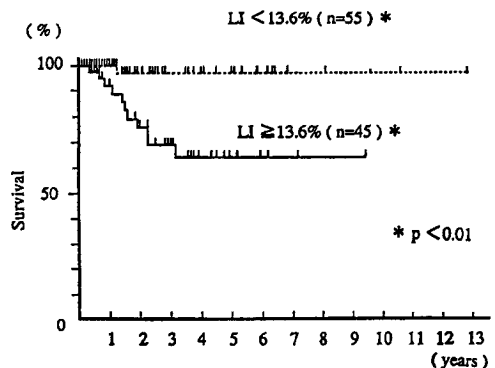


Fig. 3. Survival rate for patients with low ( $LI < 13.6\%$ ) and high ( $LI \geq 13.6\%$ ) PCNA Labeling Index (LI).

aneuploidの症例のLI:  $16.6 \pm 6.4\%$ は, diploidの症例のLI:  $9.8 \pm 5.2\%$ に対し有意に高かった ( $P < 0.01$ ).

#### 8. PCNA 陽性率と予後 (Fig. 3)

100例のPCNAのLIは正規分布を示したため, 全症例のLIの平均値13.6%を境界として2群に分け, 予後との関連につき検討した. LI 13.6%未満の群55例の5年生存率は96%, LI 13.6%以上の群45例の5年生存率は67.4%であり, LI 13.6%以上の群は有意に予後不良であった ( $P < 0.01$ ). ploidy別の予後についても検討したが, aneuploid症例が予後不良の傾向にあったが, 統計学的有意差は認められなかった.

#### 9. Stage と予後 (Fig. 4A)

Stage別の5年生存率は, stage I群: 94.9%, stage II群: 80%, stage III群: 66.1%, stage IV群: 0%とstageが進むに従い予後不良となり, 統

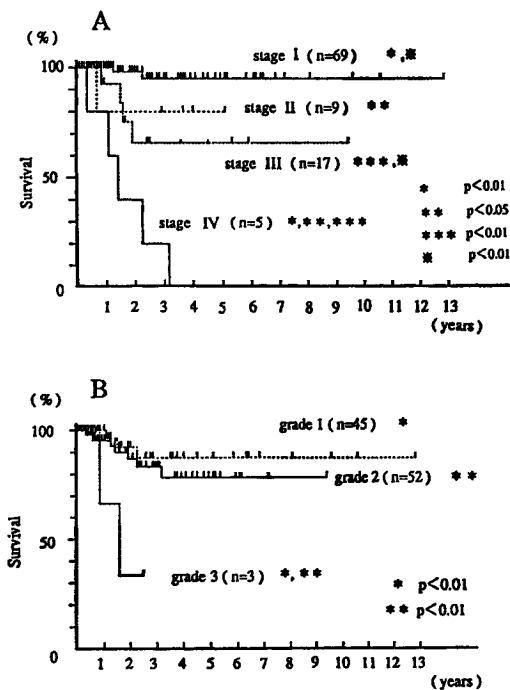


Fig. 4. Pathological stage vs. prognosis (A). Pathological grade vs. prognosis (B).

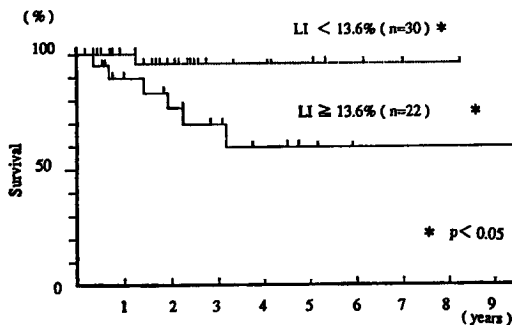


Fig. 5. Patients with grade 2 tumors are divided into two subgroups based on PCNA Labeling Index (LI).

計学的有意差を認めた。

#### 10. Grade と予後 (Fig. 4B)

Grade 別の5年生存率は、grade 1: 87.5%, grade 2: 78.7%, grade 3: 0%であり、grade 3はgrade 1および2に対し有意に予後不良であった ( $P < 0.01$ )。

#### 11. PCNA 陽性率により2群に分類した grade 2 の生存率 (Fig. 5)

Grade 2 の52例を、PCNA の LI の平均値13.6%で2群に分類し、生存率を比較した。LI が13.6%未

満の群 (30例, 5年生存率95.5%)は、LI が13.6%以上の群 (22例, 5年生存率59.5%)に比較して、生存率が有意に高かった ( $P < 0.05$ )。Ploidy pattern では grade 2 の52例を有意に分類することはできなかった。

## 考 察

PCNA は、cyclin と呼ばれる核蛋白質で、細胞周期の G1 後期から S 期にかけて合成され、DNA 合成の際に DNA polymerase- $\delta$  の補助蛋白として働く<sup>6)</sup>。従って、細胞内の PCNA 量は細胞の増殖能を反映すると考えられている。近年、癌細胞の増殖能が癌の生物学的悪性度を推測する指標として種々の研究がなされてきている。Thymidine の類似体である bromodeoxyuridine (BrdU) の取り込みにより S 期細胞を検出する BrdU 法や、Ki-67 反応性抗原による方法 (Ki-67 法) などである。しかしこれらの方法は新鮮材料を必要とするため、すでに臨床治療効果あるいは予後のわかっている症例を用いた retrospective な study には応用できなかった。一方 PCNA はホルマリン固定後のパラフィン包埋標本においても抗原性が失われず免疫組織染色が可能であるため、一般の病理標本にて細胞増殖能の解析が可能である。今回の検討では、10年前の腎細胞癌の病理組織検体からも、明瞭に染色された PCNA 陽性細胞を検出可能であった。またパラフィン包埋保存期間は、1カ月より126カ月の平均40.8カ月であったが、その期間と PCNA 染色陽性率との間には、統計学的に有意な相関関係を認めなかった ( $R = 0.12$ )。パラフィン包埋期間の PCNA 染色性におよぼす影響に関しては、包埋後20年が経過した胃癌手術標本でも良好な染色結果がえられたとの報告もある<sup>7)</sup>。PCNA 染色性の判定に際し、陽性細胞の最も多い領域を選択した理由は、癌組織内に heterogeneity がある場合、その悪性度や予後との関連が深いのは増殖細胞の最も多い領域であると考えたことによる。腫瘍組織内における PCNA 陽性細胞の局在に関して島袋ら<sup>8)</sup>は、腫瘍中心部に比べて辺縁部、特に腫瘍偽被膜直下部に陽性細胞を豊富に認めたとしている。われわれの検討でも、H.E. 染色標本にて、腫瘍中心部における血行障害や、固定不良などの所見のない部分にも PCNA 染色性の低い所見が認められた。こういった PCNA 染色性の偏りは腫瘍の heterogeneity を示していると考えられ、腫瘍の浸潤部の細胞と非浸潤部の細胞とは性質が異なることが示唆された。

さて、腎細胞癌は現在のところ手術療法以外に有効な治療法がなく、予後規定因子として stage と gra-

de が重視されている<sup>9)</sup>。本検討においても high stage 群や high grade 群は有意に生存率が不良であった。しかし組織学的異型度は必ずしも客観性のある分類とはいえず、正確に診断を下すことは病理学者にとっても困難である。したがって、客観性のある方法により悪性度を表わすことが重要な課題である。今回の検討では、組織学的異型度が強くなるほど PCNA 陽性率は高くなっていた。諸家の報告でも膀胱癌<sup>10)</sup>、乳癌<sup>11)</sup>、悪性リンパ腫<sup>12)</sup>等において組織学的異型度が高い症例ほど PCNA 陽性率も有意に高値を示したとされており、PCNA 陽性率が癌の悪性度を測る客観的指標として応用できる可能性が示唆されている。

PCNA 陽性率と予後との関係について、Brett ら<sup>13)</sup>は PCNA 陽性率18%以上の群は18%未満の群に対して有意に予後が悪く、さらに同一の stage においても、PCNA 高値群は低値群に対し予後不良であると述べている。われわれの結果では、PCNA 陽性率で grade 2 群を予後の異なる2つの subgroup に分けられることが示され、PCNA 陽性率は従来の病理組織学的な予後規定因子を補助しうる、さらに重要な予後規定因子であると思われる。

一方、FCM による DNA ploidy pattern と予後との関係について、今回の検討では、aneuploid 群が予後不良の傾向にあったが、diploid 群との間に有意差は認めなかった。諸家の報告を見ると、Rainwater ら<sup>14)</sup>は10年生存率を検討し、diploid の62%に対し、aneuploid では37%であったとし、DNA histogram は予後を推測するのに非常に有用であると述べている。永森ら<sup>15)</sup>も同様に、50例で5年生存率を検討し、diploid は93%であるのに対し、aneuploid では55%と有意に予後不良であるとしている。これに対し中野ら<sup>16)</sup>は72例の検討で、DNA ploidy は予後とは関係しないと述べており、Ekofors ら<sup>17)</sup>は96症例で5年生存率を検討し、diploid と aneuploid との間において有意差は認めず、grade が最も良く予後を反映すると述べている。こういった報告者による結果の相違の原因として、同一腫瘍内での組織の多様性 heterogeneity の問題がある。その重要性についてすでに Ljungberg ら<sup>18)</sup>や永森ら<sup>19)</sup>が報告しており、Ljungberg らは凍結標本25例の検討で56%に、永森らはパラフィン包埋標本30例の検討で63%に DNA heterogeneity を認めている。その結果、DNA ploidy の正確な判定のためには、Ljungberg らは5検体以上、永森らは4検体以上の測定が必要であると述べている。また、FCM による aneuploid ピークは、正常細胞の DNA 量と異なる細胞 (aneuploid cell)

が、全細胞数の一定の割合以上存在した時に初めて検出可能であり、大きな組織を1検体として測定した場合、小さな aneuploid のピークは多数の非癌細胞などにより隠されてしまい認識できなくなる可能性がある。これに対し PCNA 陽性率の測定では、陽性細胞の多い領域を検鏡の過程で見出すことが可能であるため、検体が大きいことは問題にならない。われわれが FCM に用いた検体は、1腫瘍より1~2検体(平均1.2検体)で、比較的大きな組織ブロックも含まれており、diploid と判定した症例の中には aneuploid 症例が存在するものと推測される。したがって今回検討した全症例において、あまり大きくない複数個の検体での解析が可能であったならば、DNA ploidy の判定がより正確となり、grade、stage とも有意に相関し、予後判定因子になった可能性があると思われる。

## 結 語

腎細胞癌100例を対象とし、PCNA 染色、および FCM による DNA ploidy の解析を行い、病理組織学的所見および臨床経過と対比、検討した。

1. PCNA 陽性率は、grade、stage と相関し、さらに grade 2 群を予後の異なる2つの subgroup に細分可能で、PCNA 陽性率は従来の病理組織学的な予後規定因子を補助しうる、重要な予後規定因子であると思われる。

2. DNA aneuploid 群は DNA diploid 群に対し予後不良の傾向にあったが有意差は認めなかった。腎細胞癌には DNA heterogeneity を示すものがあり、DNA ploidy 解析は、1腫瘍につき1個の検体で評価した場合、予後規定因子にはならなかった。

## 文 献

- 1) Miyachi K, Fritzler MJ, Tan EM, et al.: Autoantibody to a nuclear antigen in proliferating cells. *J Immunol* 121: 2228-2234, 1978
- 2) Prelich G, Tan C, Kostura M, et al.: Functional identity of proliferating cell nuclear antigen and a DNA polymerase- $\delta$  auxiliary protein. *Nature* 326: 517-520, 1987
- 3) Ogata K, Kurki P, Celis JE, et al.: Monoclonal antibodies to a nuclear protein (PCNA/cyclin) associated with DNA replication. *Exp Cell Res* 168: 475-486, 1987
- 4) 日本泌尿器科学会・日本病理学会・日本医学放射線学会編: 腎癌取扱規約. 第1版, 金原出版, 東京, 1983
- 5) Vindeløv LL, Christensen IJ, Nissen NI, et

- al.: A detergent-trypsin method for preparation of nuclei for flow cytometric DNA analysis. *Cytometry* 3: 323-327, 1983
- 6) Bravo R, Flank R, Blundell PA, et al.: Cyclin/PCNA is the auxiliary protein of DNA polymerase- $\delta$ . *Nature* 326: 515-517, 1987
- 7) 田中一成: 抗 PCNA 抗体による増殖細胞核の染色—パラフィン切片への応用—. *病理と臨* 9: 791-798, 1991
- 8) 島袋智之, 和田 尚, 栗栖弘明, ほか: 細胞増殖関連抗原 proliferating cell nuclear antigen (PCNA) の腎細胞癌組織における発現様式. *Cytometry Research* 3: 10-15, 1993
- 9) Strohmeyer T and Ackermann RI: Classic and Modern Prognostic Indicators in Renal Cell Carcinoma. *Urol Int* 47: 203-212, 1991
- 10) 黒田秀也, 安永 豊, 高寺博史, ほか: Proliferating cell nuclear antigen (PCNA) 免疫組織染色による膀胱癌の増殖能の検討. *泌尿紀要* 40: 379-382, 1994
- 11) Dawson AE, Norton JA and Weinberg DS: Comparative assessment of proliferation and DNA content in breast carcinoma by image analysis and flow cytometry. *Am J Pathol* 136: 1115-1124, 1990
- 12) Kamel OW, Lebrun DP, Davis RE, et al.: Growth fraction estimation of malignant lymphomas in formalin-fixed paraffin-embedded tissue using anti-PCNA/Cyclin. *Am J Pathol* 138: 1471-1477, 1991
- 13) Brett D, Peter B, John N, et al.: Proliferating cell nuclear antigen (PCNA) expression as a prognostic indicator for renal cell carcinoma: Comparison with tumor grade, mitotic index, and silver-staining nucleolar organizer region numbers. *J Pathol* 170: 471-477, 1993
- 14) Rainwater LM, Hosaka Y, Farrow GM, et al.: Well differentiated clear cell carcinoma—Significance of nuclear deoxyribonucleic acid patterns studied by flow cytometry—. *J Urol* 137: 15-20, 1987
- 15) 永森 聡, 坂下茂夫, 小柳知彦, ほか: Flow Cytometry による腎癌パラフィン包埋組織の核 DNA 量解析. *日泌尿会誌* 79: 1355-1368, 1988
- 16) Nakano E, Kondoh M, Okatani K, et al.: Flow Cytometric Analysis of Nuclear DNA Content of Renal Cell Carcinoma Correlated with Histologic and Clinical Features. *Cancer* 72: 1319-1323, 1993
- 17) Ekfors TO, Lipasti J, Nurmi MJ, et al.: Flow Cytometric analysis of the DNA profile of renal cell carcinoma. *Pathol Res Pract* 182: 58-62, 1987
- 18) Ljungberg B, Stenling R and Roos G: DNA content in renal cell carcinoma with reference to tumor heterogeneity. *Cancer* 56: 503-508, 1985
- 19) 永森 聡: Flow Cytometry による腎細胞癌の Heterogeneity の検討. *日泌尿会誌* 81: 593-600, 1990

(Received on October 19, 1994)

(Accepted on February 21, 1995)

(迅速掲載)